

Z Katedry Fizjologii Roślin Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS
Kierownik: prof. dr Adam Paszewski

BIBLIOTEKA
UMCS
LUBLIN

Adam PASZEWSKI, Jerzy TROJANOWSKI,
Anna ŁOBARZEWSKA

Wpływ frakcji humusowych na wzrost koleoptile owsa

Влияние гумусовых фракций на рост coleoptиле овса

**Influence of the Humus Fractions on the Growth of the
Coleoptile of Oat**

WSTĘP

Dotychczasowe badania różnych autorów nad działaniem związków próchnicznych na organizm roślinny nie doprowadzały do jednoznacznych wyników. Przyczyną tego był m. in. brak metod oczyszczania i wyodrębniania substancji humusowych w stanie nie zmienionym chemicznie, co zmuszało do posługiwania się w badaniach biologicznych zespołami substancji próchnicznych o nieznanym składzie, lub artefaktami.

Fizjologiczne oddziaływanie humusu na roślinę wyjaśniano w rozmaity sposób. Dirks (9), Gumiński (12) i inni uważają, że stymulujący wpływ humusu na wzrost roślin jest związany z jego własnościami redukcyjno-oksydacyjnymi. Inni badacze tłumaczą stymulujący wpływ substancji próchnicznych zwiększonym pobieraniem soli mineralnych przez roślinę. Ten pogląd wypowiadają między innymi Lieske (17), Niklewski i Wojciechowski (21, 22).

Inna grupa autorów uważa, że w próchnicy znajdują się stymulatory wzrostu. Za tym poglądem przemawiają np. wyniki Bottomley'a z lat 1914—20 (4). Autor ten wykazał, że w przefermentowanym kompoście torfowym znajdują się substancje wywierające działanie stymulujące na organizm rośliny i nazwał je „auksymonami”. Według Bottomley'a są to substancje typu auksyn.

W r. 1920 (5) ten sam badacz wykazał stymulujący wpływ próchnicy na rozwój rzęsy.

Bassalik (3) przypuszcza, że w ekstraktach glebowych znajduje się tzw. „auksanina” (substancja organiczna) wpływająca na wzrost. Aktywność tych wyciągów z gleby zależna jest od koncentracji.

Na uwagę zasługują również badania Hillitzera (13). Podkreśla on wzmożone wytwarzanie korzeni u roślin w obecności rozpuszczalnych w wodzie substancji próchnicznych. Badacz ten przypuszcza, że substancje próchniczne działają jak auksyny. Podobne tłumaczenie podają Chaminate i Boucher (7).

O obecności substancji wzrostowych w torfie donoszą: Zimmermann, Hitchcock i Wilcoxon (37).

Niklewski i Duda (19), oraz Niklewski i Wołnicka (23) dowiedli, że wyciągi z obornika i torfu działają chemotropicznie na korzenie gorczycy.

Niklewski i Wojciechowski (20) zauważyli, że wodne ekstrakty z torfu i czarnoziemiu wywierają stymulujące działanie na rozwój korzeni. W pracy Niklewskiego, Wójcikówny i Pestki (24) wyrażono pogląd, że do normalnego wzrostu korzeni w kulturze *in vitro* potrzebne są pewne ciała zw. „eufietycznymi”. Do nich należą m. in. różne związki próchniczne.

Brodowska-Dworakowska (6) przypuszcza, że czynnikiem wzrostowym dla *B. radicola* są kwasy próchniczne rozpuszczalne w wodzie.

Kuthy i Pecznik (16) badając wpływ obornika na wzrost kielków owsa wykazali, że pewne substancje w oborniku wywierają działanie hormonalne, podobne do efektu roślinnych substancji wzrostowych. Wyniki dotychczasowych badań nad chemizmem humusu nie wykazują chemicznego pokrewieństwa substancji próchnicznych ze znanymi auksynami. Jednak ostatnio Flaig i Breyhan (10) znaleźli związki indolowe w produktach hydrolizy kwasów humusowych z czarnoziemiu, stopionych z alkaliami. Fakt ten może nasuwać przypuszczenie o obecności układu indolowego w makromolekułach naturalnych substancji humusowych, czyli o pewnym pokrewieństwie tych ciał z fitohormonami.

Pogląd, że w humusie znajdują się stymulatory wzrostu jest, jak widać z przytoczonej literatury dość rozpowszechniony, mimo że dotąd nie udało się zidentyfikować tych domniemyanych stymulatorów z obecnie znanymi roślinnymi substancjami wzrostowymi. Zresztą stan naszych wiadomości o stymulatorach wzrostu roślin daleki jest od kompletności.

Pierwotny podział roślinnych substancji wzrostowych na auksyny i heteroauksynę nie jest już wystarczający. Housley, Booth i Phillips w roku 1956 (14) wykazali za pomocą chromatografii bibułowej obecność kilku substancji wzrostowych w ekstraktach roślinnych w zakwaszonym eterze. Efekt wzrostowy badano testem „owsianym”.

W tym samym roku Linser (18) wykazał, że kapusta zawiera co najmniej dwa hormony wzrostowe, które można wykazać metodą chromatograficzną. Ich aktywność badano testem „owsianym” Wenta oraz testem „grochowym” Wenta. W wymienionych wyżej pracach (14, 18) wykazywano również obecność substancji hormonalnych innych niż kwas indolo-3-octowy. Auksyny Kögla w nowszych badaniach nie udało się w roślinach znaleźć (1, 14, 18).

Poznane dotychczas pod względem chemicznym fitohormony stanowią zapewne tylko niewielką część wszystkich działających na rośliny czynników hormonalnych. Pozwala to przypuszczać, że w próchnicy mogą być także obecne nieznanne dotąd substancje wzrostowe, odpowiedzialne w pewnym stopniu i w określonych warunkach za fizjologiczną aktywność humusu. Obecny obraz chemizmu substancji humusowych daleki jest od kompletności zwłaszcza, że brak jest metod dla pozyskania czystych preparatów humusu dokładnie zdefiniowanych chemicznie.

Wstępne prace w tym kierunku poczynił pierwszy w r. 1947 Forsyth (11) rozdzielając za pomocą analizy absorpcyjnej fulwokwasy. Następnie Trojanowski w r. 1952 (31) i w r. 1957 (33) zastosował metodę chromatograficzną do rozdzielania frakcji alkoholowej próchnicy na kilka składników, których aktywność biologiczną badał metodą kultur wodnych (32).

Celem obecnej pracy było przebadanie testem „grochowym” niektórych frakcji próchnicy, wydzielonych chromatograficzną metodą Trojanowskiego (31, 33).

METODYKA

Jedną z biologicznych metod badania aktywności biologicznej związków jest test „grochowy” tzw. „pea test”, wprowadzony przez Wenta w r. 1934 i zmodyfikowany przez Thimanna i Schneidera w r. 1938 (28). Test „grochowy” stosują liczni autorzy (1, 15, 26, 28, 30, 34, 36) w badaniach nad substancjami wzrostowymi. W pierwotnym teście Wenta używano do badań najczęściej młodych łodyg grochu. Jak podają Thimann i Schneider (28) również koleoptile owsa nadaje się jako materiał testowy.

W niniejszej pracy posłużono się metodyką podaną przez Thimanna i Schneidera w r. 1939 (30) w dostosowaniu do owsa.

Nasiona owsa (*Avena sativa*) podkiełkowywano w ciemności przez 3—4 dni w temp. pokojowej na bibule, utrzymując stałą wilgotność około 70%. Gdy kiełki osiągnęły wielkość około 3 cm obcinano im stożek pochwy liściowej długości 2 mm. Następnie przygotowywano odcinki koleoptile długości 2 cm. Wzdłuż cylindra koleoptilowego robiono przez

środek przecięcie długości 1,5 cm w specjalnym aparacie do cięcia wg Thimanna i Schneidera (30), usuwając po przecięciu liść znajdujący się wewnątrz cylindra koleoptilowego (liść wypychano szklaną nitką). Tak przygotowane odcinki umieszczano w badanym roztworze humusu w szalkach Petri'ego o śr. 6 cm. Jako kontroli użyto: 1) roztworu IAA, 2) roztworu przygotowanego ze spopielonej frakcji humusu, oraz 3) wody redestylowanej. Szalki umieszczano w zaciemnionej kamerze w temp. pokojowej na 36 godz. Po tym okresie czasu sprawdzano stopień rozchylania się połówek przeciętego cylindra koleoptilowego. Każdą kombinację doświadczenia powtórzono 20 razy. Wyniki doświadczenia utrwalano fotograficznie (rys. 1, 2, 3, 4, 5).

Przygotowanie roztworów do doświadczeń

Do badań użyto izolowanych chromatograficznie frakcji kwasów hymatomelanowych wg metody Trojanowskiego (33), a także preparatów kompleksowych (mieszanin) tych frakcji. W dalszym ciągu pracy wprowadzono następujące oznaczenia:

- I — mieszanina kwasów hymatomelanowych z torfu niskiego.
- Ia — frakcja preparatu I o wartości $R_f = 0,53$.
- Ib — frakcja preparatu I o wartości $R_f = 0,95$.
- II — mieszanina kwasów hymatomelanowych z ziemi kompostowej 4-letniej.
- Iia — frakcja preparatu II o wartości $R_f = 0,45$.
- Iib — frakcja preparatu II o wartości $R_f = 0,53$.
- Iic — frakcja preparatu II o wartości $R_f = 0,95$.

W toku preparacji część preparatu Ia i Iib uległa denaturacji podczas destylacji próżniowej w temp. 55°C , co objawiło się znacznym zmniejszeniem ich rozpuszczalności w acetonie (strął), przy zachowaniu rozpuszczalności w rozcieńczonych alkaliach. W doświadczeniach biologicznych badano również te „częściowo zdenaturowane” frakcje, oznaczając je jako „Ia — strął” i „Iib — strął”. Dokładny opis chromatograficznej metody wydzielania w/w frakcji, oraz oznaczanie R_f umieszczony jest w pracy Trojanowskiego (33).

Preparaty humusowe odważano w ilościach: 0,01 g; 0,03 g; 0,09 g. Rozpuszczano je w niewielkiej ilości (około 4 ml) 0,1 n NaOH i dopełniano do 100 ml wodą redestylowaną ze szkła. Ustalano pH roztworów doświadczalnych na 6,6 wg elektrody szklanej. Przygotowane w ten sposób roztwory wyjściowe służyły do sporządzania rozcieńczeń: 1:10 i 1:100. Dla przekonania się, czy zaobserwowane efekty fizjologiczne nie spowodowane są działaniem substancji mineralnych w badanych frakcjach, spalano odpowiednią odważkę preparatu w piecu muflowym

w temp. 450—500°C, a otrzymany popiół rozpuszczano w niewielkiej ilości (2 ml) 30% HCl i dopełniano do 100 ml wodą, ustalając pH również na 6,6 przez dodanie NaOH.

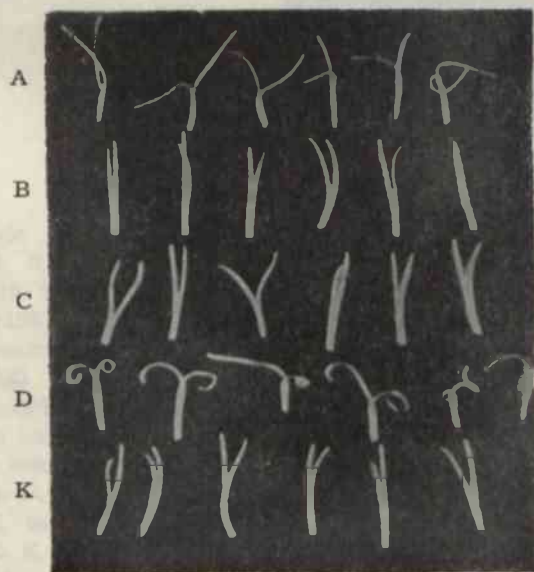
W jednej z kombinacji używano IAA (kw. indolo-3-octowego) w ilości 0,0025 g na 1000 ml H₂O (bez humusu). W kombinacji kontrolnej użyto wody redestylowanej z dodatkiem NaOH i HCl w tych ilościach, jakie dodawano przy przygotowywaniu roztworów humusowych. Wariantem kontroli był roztwór przygotowany z popiołu spalonej substancji.

Po przygotowaniu wszystkich roztworów (humusowych i kontrolnych) jeszcze raz sprawdzano czy pH wynosi 6,6.

Roztwory frakcji próchnicznych sprawdzano na obecność związków indolowych na drodze chromatograficznej wg Deuffera (8). Wolnych połączeń indolowych nie stwierdzono.

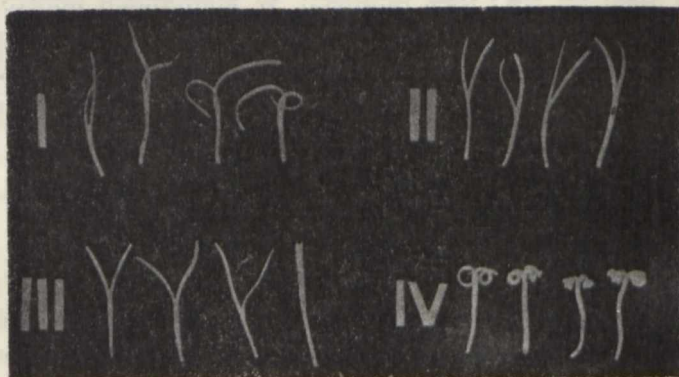
WYNIKI

Do badań użyto 9 preparatów humusu, z których 5 wykazało aktywność fizjologiczną w teście „owsianym”, tzn. połówki cylindrów koleoptilowych zaginały się do środka, jak w doświadczeniu kontrolnym z kw. indolo-3-octowym.



Ryc. 1. A — roztwór Ia w stężeniu 0,01 g/100 ml H₂O. B — roztwór A w rozcieńczeniu 1 : 10. C — roztwór A w rozcieńczeniu 1 : 100. D — roztwór IAA (kwas indolo-3-octowy) w stężeniu 0,0025 g/1000 ml H₂O. K — kontrola z wodą redestylowaną.
A — solution Ia in concentration 0,01 g/100 ml H₂O. B — solution A diluted 1 : 10. C — solution A diluted 1 : 100. D — solution IAA (indolo-3-acetic acid) in concentration 0,0025 g/1000 ml H₂O. K — control with redistilled water.

Fracje: Ia, Ib, IIa; w stężeniach 0,01 g/100 ml H₂O wykazały działanie pozytywne (wygięcie do środka), (Ryc. 1A, 2I, 3A). Natomiast frakcje: IIb i IIc użyte w tym samym stężeniu nie dają wyraźnego efektu stymulacyjnego. Efekt pojawia się przy zastosowaniu frakcji IIb w stężeniu



Ryc. 2. I — roztwór Ib w stężeniu 0,01 g/100 ml H₂O. II — roztwór I w rozcieńczeniu 1:10. III — roztwór I w rozcieńczeniu 1:100. IV — roztwór IAA (kwas indolo-3-octowy) w stężeniu 0,0025 g/1000 ml H₂O.

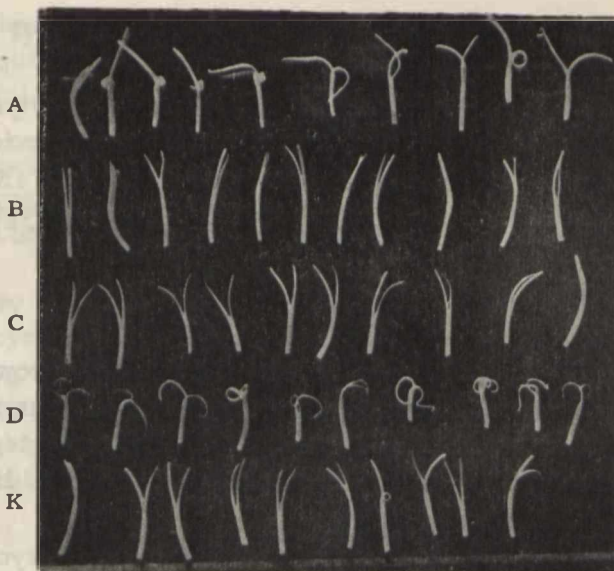
I — solution Ib in concentration 0,01 g/100 ml H₂O. II — solution I diluted 1:10.
III — solution I diluted 1:100. IV — solution IAA in concentration 0,0025 g/1000 ml H₂O.



Ryc. 3. A — roztwór IIa w stężeniu 0,01 g/100 ml H₂O. B — roztwór A w rozcieńczeniu 1:10. C — roztwór A w rozcieńczeniu 1:100. K — kontrola z wodą redestylowaną. D — roztwór IAA (kwas indolo-3-octowy) w stężeniu 0,0025 g/1000 ml H₂O.
A — solution IIa in concentration 0,01 g/100 ml H₂O. B — solution A diluted 1:10.
C — solution A diluted 1:100. K — control with redistilled water. D — solution IAA in concentration 0,0025 g/1000 ml H₂O.

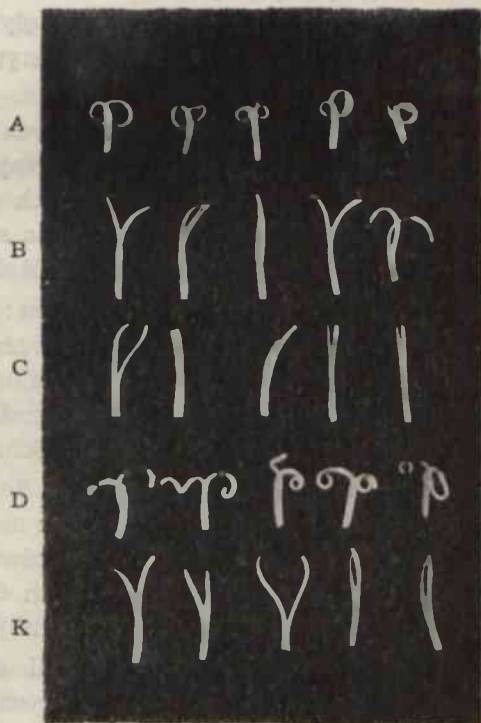
Ryc. 4. A — roztwór II b w stężeniu 0,03 g/100 ml H₂O. B — roztwór A w rozcieńczeniu 1 : 10. C — roztwór A w rozcieńczeniu 1 : 100. D — roztwór IAA (kwas indolo-3-octowy) w stężeniu 0,0025 g/1000 ml H₂O. K — Kontrola z wodą redestylowaną.

A — solution II b in concentration 0,03 g/100 ml H₂O. B — solution A diluted 1 : 10. C — solution A diluted 1 : 100. D — solution IAA in concentration 0,0025 g/1000 ml H₂O. K — control with redistilled water.



Ryc. 5. A — roztwór II c w stężeniu 0,09 g/100 ml H₂O. B — roztwór A w rozcieńczeniu 1 : 10. C — roztwór A w rozcieńczeniu 1 : 100. D — roztwór IAA (kwas indolo-3-octowy) w stężeniu 0,0025 g/1000 ml H₂O. K — kontrola z wodą redestylowaną.

A — solution II c in concentration 0,09 g/100 ml H₂O. B — solution A diluted 1 : 10. C — solution A diluted 1 : 100. D — solution IAA in concentration 0,0025 g/1000 ml H₂O. K — control with redistilled water.



0,03 g/100 ml H₂O (Ryc. 4A). Frakcja IIc dała efekt dopiero w stężeniu 0,09 g/100 ml H₂O (Ryc. 5A). Przy dziesięciokrotnym rozcieńczeniu wyżej wymienionych frakcji działanie znacznie się zmniejsza. (Ryc. 1B, 2II,

3B, 4B, 5B). Przy większym rozcieńczeniu (1:100) wpływ tych frakcji zupełnie zanika. (Ryc. 1C, 2III, 3C, 4C, 5C). Frakcje: I, II, „Ia-strą”, „Iib-strą” nie wykazują aktywności w użytym teście. W kombinacji kontrolnej z wodą redestylowaną ramiona rozciętych cylindrów koleoptilowych rozchylały się na zewnątrz. (Ryc. 1K, 3K, 4K, 5K). Kontrola z kw. indolo-3-octowym wykazuje zawsze wygięcie do środka. (Ryc. 1D, 2IV, 3D, 4D, 5D).

DYSKUSJA

Doświadczenia w niniejszej pracy przeprowadzono w celu zbadania aktywności stymulacyjnej oczyszczonych chromatograficznie substancji humusowych (31, 33) na koleoptile owsa. Do tego celu użyto testu „grochowego Wenta zmodyfikowanego w r. 1938 przez Thimanna Schneidera (30).

Uzyskane w roztworach frakcji humusowych w odpowiednich stężeniach efekty były podobne to działania kw. indolo-3-octowego (IAA). W roztworach IAA ramiona rozciętych cylindrów koleoptilowych zagięły się do środka zgodnie ze znanymi stwierdzeniami Södinga (26), Audusa (1) i innych.

Efekt wyginania się przeciętych połówek cylindra koleoptilowego jedni tłumaczą tym, że tkanki zostają zranione i następuje mechaniczne podrażnienie (35). W innych pracach (25, 26, 28, 29, 30) autorzy wyjaśniają, że istotnym powodem wyginania się połówek rozciętych łodyg grochu, lub koleoptile owsa są wrodzone różnice w reagowaniu na auksyny.

Substancje humusowe oznaczone: Ia, Ib, IIa, IIc są aktywne fizjologicznie podobnie jak IAA. Jest rzeczą interesującą, że tę aktywność wykazują tylko pewne frakcje wydzielone drogą chromatograficzną z grupy tzw. kw. hymatomelanowych. Pozostałe preparaty: I, II, które nie dały efektu, są zespołami związków próchnicznych.

Można by zatem przypuszczać, że w badanych kompleksach kw. hymatomelanowych nie ujawnia się z nieznanых powodów aktywność fizjologiczna w danych warunkach doświadczenia, natomiast aktywność ta pojawia się w niektórych frakcjach dopiero po wyizolowaniu ich z mieszaniny na drodze chromatograficznej.

Trudno jest w obecnej chwili sformułować hipotezę wyjaśniającą mechanizm oddziaływania badanych frakcji humusu. Chociaż w tych frakcjach nie stwierdzono wolnych związków indolowych, ale na podstawie pracy Bassalika (3), Linsera (18), Streeta (27), Audusa (2), Housley'a (14) można przypuszczać, że podobnie jak IAA mogą działać nie tylko związki indolowe.

Brak efektu w doświadczeniach z frakcjami: „Ia-strą” i „IIb-strą” można by wyjaśnić ich zmniejszoną rozpuszczalnością. Substancje te uległy częściowo denaturacji w toku preparatyki wskutek działania zbyt wysokiej temperatury.

Na podstawie przedstawionych wyników można by zatem wysnuć przypuszczenie, że oczyszczone frakcje kw. hymatomelanowych wywierają na przecięte koleptile owsa działanie podobne do znanych substancji wzrostowych.

Dla przekonania się, czy efekty zgęściowe nie są spowodowane obecnością substancji mineralnych w roztworach badanych, spalano preparat i badano aktywność fizjologiczną popiołu.

Wyniki tych prób potwierdziły przypuszczenie, że działanie analogiczne do IAA wywierają badane substancje organiczne, a nie ewentualne zanieczyszczenia mineralne, o których wspomina w r. 1933 Bassalik (3).

WNIOSKI

1. Zastosowano zmodyfikowany test „grochowy” (pea test) Wenta (28, 30) używając koleoptile owsa dla stwierdzenia fizjologicznej aktywności badanych substancji humusowych.

2. Przy pomocy tej metody stwierdzono:

- a) niektóre z chromatograficznie oczyszczonych frakcji kw. hymatomelanowych wywierają wpływ stymulujący, podobnie jak kw. indolo-3-octowy.
- b) efekt fizjologiczny badany w teście „grochowym” frakcji kw. hymatomelanowych był zależny od stężenia.
- c) nieoczyszczone i nierozdzielone kompleksy kw. hymatomelanowych nie wykazują w tych warunkach fizjologicznej aktywności.
- d) zaobserwowane efekty przypuszczalnie nie wynikały z obecności zanieczyszczeń mineralnych w badanych preparatach.

3. W badanych preparatach nie stwierdzono obecności wolnych związków indolowych.

PISMIENNICTWO

1. Audus L. J.: Plant Growth Substances, Londyn 1953.
2. Audus L. J.: Endeavour, XI, 56, 1955.
3. Bassalik K. i Neugebauer J.: Acta Soc. Bot. Pol., X, 4, 1933.
4. Bottomley W.: Proc. Roy. Soc. Londyn, 88, 237, 1914; 89, 102, 1917; 91, 83, 1919. wg Kononowej M., Zagadnienie Próchnicy Glebowej, W-wa 1955.
5. Bottomley W.: Ann. of Botany., 34, 345, 1920.
6. Brodowska-Dworakowska A.: Acta Soc. Bot. Pol., XVI, 1939.

7. Chaminade R. et Boucher J.: Compt. Rend. Acad. Agric. de France., 26, 66, 1940 wg Kononowej M., Zagadnienie Próchnicy Glebowej. W-wa 1955.
 8. D. v. Deuffer, Behrens M., Fischer A.: Naturwiss., 39, 258, 1952.
 9. Dirks B.: Ztschr. Bodenkunde u. Pfl-ernähr., 21/22, 1940.
 10. Flaig W. und Breyhan Th.: Ztschr. Bodenkunde u. Pfl-ernähr., 75, (120, 2, 132), 1956.
 11. Forsyth W. A. C.: Bioch. Journal., 47, 1947.
 12. Gumiński S.: Acta Soc. Bot. Pol., XX, 2, 1950.
 13. Hillitzer A.: Beihefte Bot. Zentrbl., 49, 467, 1932. wg Kononowej M.; Zagadnienie Próchnicy Glebowej. W-wa 1955.
 14. Housley S., Booth A. and Phillips J. D. J., Nature., 178, 4527, 255, 1956.
 15. Jones F. R. H., Hentbest H. B., and Smith G. F., and Bentley J. A.: Nature, 169, 4299, 485, 1952.
 16. Kuthy A., Pecznik J.: Bodenkunde u. Pfl-ernähr., 23, 83, 1941.
 17. Lieske R.: Ztschr. f. angew. Chemie., 1932. wg Trojanowskiego J., Acta Soc. Bot. Pol., XXIII, 1, 144, 1954.
 18. Linser H.: Planta, 39, 377, 1951.
 19. Niklewski B., Duda J.: Bioch. Zschr., 1936.
 20. Niklewski B., Wojciechowski P.: Bodenkunde u. Pfl-ernähr., Berlin, 4, 294, 1937.
 21. Niklewski B., Wojciechowski J.: Acta Soc. Bot. Pol., XV, 1938.
 22. Niklewski B., Wojciechowski J.: Acta Soc. Bot. Pol., XVIII, 1947.
 23. Niklewski B., Wolnicka J.: On the Morphological Phenomena of Roots Chemotropically Excited. Kraków 1937.
 24. Niklewski B., Wójcikówna Z. i Peştka M.: Acta Soc. Bot. Pol., XVI, 2, 1939.
 25. Overbek J., Went W.: Bot. Gaz., 99, 22—24, 1937/38.
 26. Söding H.: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart 1952.
 27. Street H. E.: Nature., 173, 4397, 255, 1954.
 28. Thimann K. V., Schneider C. L.: Amer. J. Bot., 25, 627, 1938.
 29. Thimann K. V., Schneider C. L., Amer. J. Bot., 26, 5, 328, 1939.
 30. Thimann K. V., Schneider C. L.: Amer. J. Bot., 26, 10, 792, 1939.
 31. Trojanowski J.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, vol. VI, 298, Lublin 1952.
 32. Trojanowski J.: Acta Soc. Bot. Pol., XXIII, 1, 144, 1954.
 33. Trojanowski J.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C, vol. X, 1957.
 34. Went F. W., Thimann K. V.: Phytohormones, 1937.
 35. Went F. W.: Bull. Torrey Bot. Club., 66 wg Thimanna K. V. i Schneidera C. L., Amer. J. Bot., 26, 5, 1939.
 36. Wieland O. P., De Ropp R. S., Avenier J.: Nature, 173, 4408, 776, 1954.
 37. Zimmermann P. W., Hitchcock A. E., Wilcoxon F.: Contrib. Boyce Thompson Inst., 8, 105, 1936. Wg Kuthy'ego A. i Pecznika J., Bodenkunde u. Pfl-ernähr., 23, 83, 1941.
-

РЕЗЮМЕ

Для изучения физиологической активности некоторых фракций гиматомелановых кислот, а равным образом и смесей этих фракций был применен модифицированный „гороховой” тест Went'a (28, 30).

Фракционирование было произведено хроматографически на целлюлозе по методу Трояновского (33).

Фракции обозначались следующим образом:

I — смесь гиматомелановых кислот из низинного торфа.

Ia — фракция препарата I с величиной $R_f = 0,53$

Ib — фракция препарата I с величиной $R_f = 0,95$

II — смесь гиматомелановых кислот из компоста (четырёхлет-ного).

IIa — фракция препарата II с величиной $R_f = 0,45$

IIb — фракция препарата II с величиной $R_f = 0,53$

IIc — фракция препарата II с величиной $R_f = 0,95$

В течение заготовки препаратов часть препаратов Ia и IIb подвергалась денатурации во время дистилляции в вакууме при температуре 55°C , что проявилось в значительном снижении их растворимости в ацетоне (осадок), при сохранении способности растворяться в разведенных основаниях.

В биологических экспериментах подвергнуто исследованию также и те частично денатурированные фракции, обозначая их как „Ia — осадок” и „IIb — осадок”. Для контроля были использованы: 1) редистиллированная вода + NaOH и HCl, в таких же количествах, какие прибавлялись для приготовления растворов; 2) IAA (индоло-3-уксусная кислота); 3) раствор приготовленный из испеленной гумусовой субстанции.

Растворы гумусовых фракций подвергались контролю на наличие индоловых соединений.

Авторами установлено:

1) Некоторые из хроматографически очищенных фракций гиматомелановых кислот оказывают стимулирующее влияние на рост, аналогично как и индоло-3-уксусная кислота.

2) Физиологический эффект наблюдаемый в „гороховом” тесте фракций гиматомелановых кислот находился в зависимости от концентрации.

3) Неочищенные и неразделенные комплексы гиматомелановых кислот не проявляют в этих условиях физиологической активности.

4) Причиной наблюдаемых эффектов не было наличие минеральных загрязнений в исследуемых препаратах.

5) В исследуемых фракциях не обнаружено наличия свободных индоловых соединений.

Влияние употребленных в опытах гумусовых субстанций на влагалища перерезанных колеоптилей овса иллюстрируют рисунки: 1, 2, 3, 4, 5.

О Б Ъ Я С Н Е Н И Я К Р И С У Н К А М

Рис. 1. А — Раствор Ia, концентрация 0,01 г/100 мл H_2O , В — Раствор А, разведение 1:10, С — Раствор А, разведение 1:100, D — Раствор IAA (индоло-3-уксусная кислота), концентрация 0,0025 г/1000 мл H_2O , К — Контроль редистиллированной водой.

Рис. 2. I — Раствор Ib, концентрация 0,01 г/100 мл H_2O , II — Раствор I, разведение 1:10, III — Раствор I, разведение 1:100, IV — Раствор IAA, индоло-3-уксусная кислота), концентрация 0,0025 г/1000 мл H_2O .

Рис. 3. А — Раствор IIa, концентрация 0,01 г/100 мл H_2O , В — Раствор А, разведение 1:10, С — Раствор А, разведение 1:100, К — Контроль редистиллированной водой, D — Раствор IAA, (индоло-3-уксусная кислота (концентрация 0,0025 г/1000 мл H_2O).

Рис. 4. А — Раствор II концентрация 0,03 г/100 мл H_2O , В — Раствор А, разведение 1:10, С — Раствор А, разведение 1:100, D — Раствор IAA, (индоло-3-уксусная кислота), концентрация 0,0025 г/1000 мл H_2O , К — Контроль редистиллированной водой.

Рис. 5. А — Раствор IIc, концентрация 0,09 г/100 мл H_2O , В — Раствор А, разведение 1:10, С — Раствор А, разведение 1:100, D — Раствор IAA (индоло-3-уксусная кислота), концентрация 0,0025 г/1000 мл H_2O , К — Контроль редистиллированной водой.

S U M M A R Y

With the purpose to investigate the physiological activity of some fractions of hymatomelanin acids and of mixtures of these fractions, a modification of the „pea” test according to Went (28, 30) was used.

Chromatographic partition was carried out on cellulose according to Trojanowski (33).

The fractions were determined as follows:

I — mixture of hymatomelanin acids from low peat,

Ia — fraction of preparation I of R_f value = 0.53,

Ib — fraction of preparation I of R_f value = 0.95,

II — mixture of hymatomelanin acids from compost earth (4 years old),

IIa — fraction of preparation II of R_f value = 0.45,

IIb — fraction of preparation II of R_f value = 0.53,

IIc — fraction of preparation II of R_f value = 0.95.

During the procedure a part of preparations Ia and IIb became denatured while distilled in vacuum at $55^\circ C$, which resulted in a considera-

ble decrease of their solubility in acetone (precipitate), their solubility in diluted alkalis remaining unchanged.

These partly denatured fractions were used in biological experiments and were marked as „Ia — precipitate” and „Iib — precipitate”. As control were used: 1. redistilled water + NaOH and HCl in the same quantity as used for the preparation of solutions, 2. IAA (indolo-3-acetic acid), 3. solution prepared from ashes of humus substance.

Solutions of humic fractions were checked for the presence of indole compounds.

The research made possible the following conclusions:

1. Some of the chromatographically purified fractions of hymatomelanic acids have a stimulating influence on the growth of plants, which is similar to that of indolo-3-acetic acid.

2. The physiological effect of the fractions of hymatomelanic acids investigated by means of the „pea” test depended on the concentration.

3. In these conditions non-purified and non-partitioned complexes of hymatomelanic acids do not show any physiological activity.

4. The observed effects did not result from the presence on mineral admixtures in the examined preparations.

5. No free indole compounds were found in the investigated fractions.

The influence of the humus substances used in the experiments on the cylinders of sectioned coleoptiles of oat is shown in Figures 1, 2, 3, 4, and 5.

